

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/000231

International filing date: 10 January 2005 (10.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE  
Number: 10 2004 002 257.7  
Filing date: 09 January 2004 (09.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 March 2005 (21.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

04.03.2005

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 10 2004 002 257.7

**Anmeldetag:** 09. Januar 2004

**Anmelder/Inhaber:** Epigenomics AG, 10435 Berlin/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-Methylierungen in DNA mit Hilfe von DNA-Reparaturenzymen

**IPC:** C 12 Q 1/68

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 24. Februar 2005  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

  
Wehner

## Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-Methylierungen in DNA mit Hilfe von DNA-Reparaturenzymen

5

### Hintergrund der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin in DNA. 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryontischer Zellen. Sie spielt eine wichtige biologische Rolle, u.a. bei der Transkriptionsregulation, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese (zur Übersicht: Millar et al.: Five not four: History and significance of the fifth base. In: The Epigenome, S. Beck and A. Olek (eds.), Wiley-VCH Verlag Weinheim 2003, S. 3-20). Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichen Interesse. Ein Nachweis der Methylierung ist allerdings schwierig, da Cytosin und 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweisen. Viele der herkömmlichen, auf Hybridisierung beruhenden Nachweisverfahren vermögen daher nicht zwischen Cytosin und Methylcytosin zu unterscheiden. Zudem geht die Methylierungsinformation bei einer PCR-Amplifikation vollständig verloren.

25

Die herkömmlichen Methoden zur Methylierungsanalyse arbeiten im wesentlichen nach zwei unterschiedlichen Prinzipien. Zum einen werden methylierungsspezifische Restriktionsenzyme benutzt, zum anderen erfolgt eine selektive chemische Umwandlung von nicht-methylierten Cytosinen in Uracil (sog.: Bisulfit-Behandlung, siehe etwa: DE 101 54 317 A1; DE 100 29 915 A1). Die enzymatisch oder chemisch vorbehandelte DNA wird dann meist amplifiziert

30

und kann auf unterschiedliche Weise analysiert werden  
(zur Übersicht: WO 02/072880 S. 1 ff). Von großem Interesse sind dabei Verfahren, die in der Lage sind, Methylierung sensitiv und quantitativ zu detektieren. Dies  
5 gilt aufgrund der wichtigen Rolle der Cytosin-Methylierung in der Krebsentstehung insbesondere in Hinblick auf diagnostische Anwendungen. Von besonderer Bedeutung sind dabei Methoden, die es erlauben, abweichende Methylierungsmuster in Körperflüssigkeiten, etwa in Serum,  
10 nachzuweisen. Denn anders als die instabile RNA ist DNA oft in Körperflüssigkeiten anzutreffen. Bei destruktiven pathologischen Prozessen wie Krebserkrankungen ist die DNA-Konzentration im Blut sogar erhöht. Eine Krebsdiagnostik über eine Methylierungsanalyse von in Körperflüssigkeiten befindlicher Tumor-DNA ist also möglich und  
15 schon mehrfach beschrieben (siehe etwa: Palmisano et al.: Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. Cancer Res. 2000 Nov 1;60(21):5954-8). Ein besonderes Problem besteht jedoch darin, dass  
20 sich in den Körperflüssigkeiten neben der DNA mit dem krankheitstypischen Methylierungsmuster eine große Menge an DNA der gleichen Sequenz aber eines anderen Methylierungsmusters befindet. Die Diagnoseverfahren müssen daher in der Lage sein, geringe Mengen besonders methylierter  
25 DNA vor einem starken Hintergrund an DNA derselben Sequenz aber eines anderen Methylierungsmusters (im folgenden: Hintergrund-DNA) nachzuweisen.

Die herkömmlichen Verfahren zur Methylierungsanalyse lösen  
30 dieses Problem nur eingeschränkt. Üblicherweise wird die chemisch vorbehandelte DNA mittels eines PCR-Verfahrens amplifiziert. Über die Verwendung methylier-

5      rungsspezifischer Primer oder Blocker soll dann eine selektive Amplifikation nur der methylierten (bzw. bei umgekehrten Ansatz: unmethylierten) DNA gewährleisten werden. Der Einsatz methylierungsspezifischer Primer ist als  
10      sog. „methylierungssensitive PCR“ bekannt („MSP“; Herman et al.: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Sep 3;93(18):9821-6). Ein vergleichbar sensitives Verfahren ist die sogenannte „Heavy Methyl“-Methode. Dabei wird eine spezifische Amplifizierung nur der ursprünglich methylierten (bzw. unmethylierten) DNA durch Einsatz von methylierungsspezifischen Blocker-Oligomeren erreicht (zur Übersicht: WO 02/072880). Sowohl MSP wie Heavy Methyl sind als quantifizierbare Real-Time-  
15      Varianten anwendbar. Diese ermöglichen es, den Methylierungsstatus weniger Positionen direkt im Verlauf der PCR nachzuweisen, ohne dass eine nachfolgende Analyse der Produkte erforderlich wäre („MethyLight“ - WO00/70090; US 6,331,393). Eine Ausführungsform ist dabei das „Taqman“-  
20      Verfahren. Dieses verwendet Sondenmoleküle, die ein Fluoreszenzfarbstoff-Quencher-Paar tragen. Die Sonden hybridisieren sequenzspezifisch an die Amplifikate und werden im Zuge des nächsten Amplifikationszyklus durch die Exonuklease-Aktivität der Polymerase abgebaut. Durch die  
25      Trennung von Quencher und Farbstoff entsteht ein detektierbares Fluoreszenz-Signal (siehe etwa Eads et al.: MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. Nucleic Acids Res. 2000 Apr 15;28(8):E32). Eine weitere MethyLight-Ausführungsform ist das sog. Lightcycler-Verfahren. Dabei werden zwei unterschiedliche Sonden eingesetzt, die in unmittelbarer Nähe zueinander an das Amplifikat hybridisieren, und die dann über Fluoreszenz-

Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ein detektierbares Signal erzeugen.

Die Anwendbarkeit dieser Verfahren für einen sensitiven und spezifischen Nachweis methylierter DNA vor einem großen Hintergrund an unmethylierter DNA ist allerdings beschränkt. So besteht die Gefahr, dass es über eine unspezifische Amplifikation von Hintergrund-DNA zu falsch-positiven Ergebnissen kommt. Um die Spezifität der Amplifikation zu erhöhen ist es daher notwendig, Primer- oder Blockersequenzen zu verwenden, in den mehrere methylierungsspezifische Positionen enthalten sind. Diese Sequenzanforderungen schränken die Anwendbarkeit des Verfahrens wiederum ein.

Aufgrund der besonderen biologischen und medizinischen Bedeutung der Cytosin-Methylierung und aufgrund der oben erwähnten Nachteile des Standes der Technik besteht ein großes technisches Bedürfnis an der Entwicklung leistungsfähiger Methoden zur Methylierungsanalyse. Im folgenden ist ein solches Verfahren beschrieben.

Erfindungsgemäß wird die zu untersuchende DNA zunächst chemisch vorbehandelt, danach mit Oligonukleotidsonden hybridisiert und anschließend mit DNA-Reparaturenzymen umgesetzt. Eine Ausführungsform der Erfindung erlaubt so einen spezifischen Abbau der Hintergrund-DNA. Damit wird eine selektive Amplifikation allein derjenigen DNA, deren Methylierungsstatus nachgewiesen werden soll, erleichtert. Eine sehr sensitive und sehr spezifische Methylierungsanalyse ist möglich. Der Anwendungsbereich des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dabei breiter als der der

bereits bekannten Methodik (s.o.). Denn methylierungsspezifische Primer- oder Blockersequenzen sind nicht in gleichem Maße erforderlich.

5 Eine andere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens benutzt die Hybridisierung und den Einsatz der DNA-Reparaturenzyme nicht zum Abbau der Hintergrund-DNA, sondern direkt zum Nachweis des Methylierungsstatus. Ein  
10 ähnliches Verfahren zur Mutationsanalyse ist unter dem Namen „Midas“ beschrieben (Bazar et al: Mutation identification DNA analysis system (MIDAS) for detection of known mutations. Electrophoresis. 1999 Jun;20(6):1141-8; US-Patent 5,656,430). Dabei wird ein Oligonukleotid an die zu untersuchende DNA hybridisiert. An der nachzuweisenden Mutation bildet sich eine Basenfehlpaarung, die  
15 anschließend durch ein Mismatch Repair Enzym erkannt wird. Die Sonde wird an dieser Stelle geschnitten, und die Fragmente können über unterschiedliche Methoden nachgewiesen werden. Wird ein Überschuss an Sonden verwendet, so kann der Prozess wiederholt ablaufen. Ein weiteres  
20 ähnliches Verfahren zur Mutationsanalyse ist von Zhang et al. beschrieben (An amplification and ligation-based method to scan for unknown mutations in DNA. Hum Mutat. 2002 Aug;20(2):139-47). Dabei wird die zu untersuchende  
25 DNA zunächst mittels einer PCR amplifiziert. Anschließend erfolgt eine Crosshybridisierung der Amplifikate unter Bildung von Basenfehlpaarungen. Danach werden durch Umsatz mit Reparaturenzymen Einzelstrangbrüche eingeführt. Schließlich werden an die geschnittene DNA spezifisch  
30 Primer ligiert, mit deren Hilfe die Mutation spezifisch nachgewiesen werden kann.

Die Anwendung dieser beiden Verfahren auf die Methylierungsanalyse wird im folgenden zum ersten Mal beschrieben. Aufgrund der besonderen biologischen und medizinischen Bedeutung der Cytosinmethylierung und aufgrund der Nachteile der bekannten Verfahren stellt das Eröffnen dieser vorteilhaften, neuen Technologie einen wichtigen technischen Fortschritt dar.

### Beschreibung

Das erfindungsgemäße Verfahren verwendet DNA-Reparaturenzyme zur Analyse von Cytosinmethylierungen. Die Erfindung beruht dabei auf folgendem Prinzip: Zunächst wird die zu untersuchende DNA so umgewandelt, dass sich ursprünglich methylierte und unmethylierte DNA in ihrer Basensequenz unterscheiden. Anschließend wird die zu untersuchende DNA mit Oligonukleotiden hybridisiert. Dabei bilden sich je nach Methylierungsstatus der DNA entweder Hybride mit Fehlpaarungen oder Hybride ohne Fehlpaarungen. In einer anderen Ausführungsform bilden sich je nach Methylierungsstatus der DNA entweder Hybride mit Fehlpaarungen oder keine Hybride. Die fehlgepaarten Hybride werden von den DNA-Reparaturenzymen erkannt und geschnitten. Anschließend kann auf unterschiedliche Weise der Methylierungszustand der DNA bestimmt werden.

Demnach handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren um ein Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen, das dadurch gekennzeichnet ist, dass

- a) die zu untersuchende DNA chemisch oder enzymatisch so umgesetzt wird, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,



- b) die umgewandelte DNA mit Oligonukleotiden hybridisiert wird, wobei die DNA des einen Methylierungsstatus Hybride mit Basenfehlpaarungen bildet, während die DNA des anderen Methylierungsstatus Hybride ohne Basenfehlpaarungen oder keine Hybride bildet,
- c) ein Strang der fehlgepaarten Hybride enzymatisch geschnitten wird,
- d) die ungeschnittene DNA oder die geschnittenen Fragmente nachgewiesen werden,
- e) aus dem Signal auf den Methylierungsstatus der untersuchten DNA geschlossen wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist in zwei prinzipiell unterschiedlichen Ausführungsformen durchführbar. In der ersten Variante werden genau an den Positionen, deren Methylierungsstatus untersucht werden soll, Basenfehlpaarungen gebildet. Demnach bilden sich bei der Hybridisierung entweder Hybride mit oder ohne Basenfehlpaarungen. In der zweiten Variante werden die Basenfehlpaarungen außerhalb der zu untersuchenden Positionen gebildet. Je nach Methylierungsstatus der DNA bilden sich dann Hybride mit Basenfehlpaarungen oder keine Hybride.

Die erste Ausführungsform ist also dadurch gekennzeichnet, dass oben in Schritt b) die DNA des einen Methylierungsstatus Hybride mit Basenfehlpaarungen bildet, während die DNA des anderen Methylierungsstatus Hybride ohne Basenfehlpaarungen bildet.

Im ersten Schritt dieser Ausführungsform wird die zu untersuchende DNA mit einer Chemikalie oder mit einem Enzym so umgesetzt, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet. Dabei kann die zu un-

tersuchende DNA je nach diagnostischer oder wissenschaftlicher Fragestellung aus unterschiedlichen Quellen stammen. Für diagnostische Fragestellungen dienen als Ausgangsmaterial bevorzugt Gewebeproben, aber auch Körperflüssigkeiten, insbesondere Serum. Möglich ist auch, die DNA aus Sputum, Stuhl, Urin oder Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit zu verwenden. Vorzugsweise wird die DNA zunächst aus der biologischen Probe isoliert. Die DNA-Extraktion erfolgt nach Standardmethoden, aus Blut etwa unter Verwendung des Qiagen UltraSens DNA Extraktions-Kits. Die isolierte DNA kann dann z.B. durch Umsatz mit Restriktionsenzymen fragmentiert werden. Die Reaktionsbedingungen und die in Frage kommenden Enzyme sind dem Fachmann bekannt und ergeben sich etwa aus den von den Herstellern mitgelieferten Protokollen. Anschließend wird die DNA chemisch oder enzymatisch umgewandelt. Bevorzugt erfolgt eine chemische Umsetzung mittels Bisulfit. Die Bisulfitumwandlung ist dem Fachmann in unterschiedlichen Variationen bekannt (siehe etwa: Frommer et al.: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Mar 1;89(5):1827-31; Olek, A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 Dec 15;24(24):5064-6.; DE 100 29 915; DE 100 29 915). Besonders bevorzugt erfolgt die Bisulfitumwandlung in Gegenwart von denaturierenden Lösemitteln, etwa Dioxan, und eines Radikalfängers (vgl.: DE 100 29 915). In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die DNA nicht chemisch, sondern enzymatisch umgewandelt. Dies ist etwa durch Einsatz von Cytidin-Deaminasen denkbar, die unmethylierte Cytidine schneller umsetzen als methylierte

Cytidine. Ein entsprechendes Enzym ist kürzlich identifiziert worden (Bransteitter et al.: Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1;100(7):4102-7).

Durch die chemische oder enzymatische Vorbehandlung werden methylierte und unmethylierte DNA in unterschiedliche DNA-Sequenzen überführt. Dabei unterscheiden sich die Sequenzen nur an denjenigen Positionen, an den vorher ein unterschiedlicher Methylierungsstatus vorlag. Nach einer Bisulfitbehandlung liegt an einer ursprünglich methylierten Cytosinposition ein Cytosin vor, während an einer ursprünglich unmethylierten Cytosinposition ein Uracil auftritt. Im übrigen sind beide DNA-Sequenzen identisch. Dieses macht sich erfindungsgemäß zunutze, indem man nachfolgend an die umgewandelte DNA Oligonukleotide hybridisiert. Dabei sind die Oligonukleotide vollständig komplementär nur zu einer der umgewandelten Sequenzen. Die andere Sequenz bildet mit den Oligonukleotiden an den unterschiedlich methylierten Positionen Basenfehlpaarungen.

Im zweiten Schritt des erfindungsgemäße Verfahren wird demnach die umgewandelte DNA mit Oligonukleotiden hybridisiert, wobei je nach Methylierungsstatus der DNA Hybride mit oder ohne Basenfehlpaarungen gebildet werden.

Bei bisulfitbehandelter DNA kommt dabei nur eine begrenzte Art an Basenfehlpaarungen in Betracht. So enthält die ursprünglich unmethylierter DNA ein Uracil an der Stelle, an der sich im methylierten Strang ein Cytosin befindet.

Dementsprechend kann es je nach der Sequenz des eingesetzten Oligonukleotids zu U $\leftrightarrow$ G oder zu C $\leftrightarrow$ A Fehlpaarungen kommen. Wird die zu untersuchende DNA nach der Bisulfitbehandlung zunächst amplifiziert, so können weitere Fehlpaarungen ausgenutzt werden. Werden im Zuge der Amplifikation statt Uracil- Thyminnukleosidtriphosphate angeboten, so steht anschließend auch eine T $\leftrightarrow$ G-Fehlpaarung zur Verfügung. Zudem können nach einer Amplifikation auch erstmals die komplementären Stränge untersucht werden (durch die Bisulfitumwandlung entstehen zunächst nur zwei DNA-Stränge, die nicht mehr miteinander komplementär sind). Möglich ist es daher auch, A $\leftrightarrow$ C oder G $\leftrightarrow$ T Fehlpaarungen auszunutzen. Es liegt nahe, dass es zu weiteren Fehlpaarungen kommen kann, wenn die Oligonukleotide andere als die herkömmlichen DNA-Basen enthalten. Trägt die Sonde etwa Uracil statt Thymin, so können treten auch G $\leftrightarrow$ U-Fehlpaarungen auftreten. Entsprechende Ausführungsformen sind von dieser Anmeldung eingeschlossen.

Welche der oben genannten Fehlpaarungen erfindungsgemäß zum Methylierungsnachweis verwendet werden, hängt von der zu untersuchenden Fragestellung, vom dem weiteren experimentellen Vorgehen und von den eingesetzten Enzymen ab. Gleiches gilt für die Frage, ob die eingesetzten Oligonukleotide die fehlgepaarten Hybride mit der nachzuweisenden DNA oder mit der Hintergrund-DNA bilden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist hier in unterschiedlichen Variationen ausführbar.

In einer Ausführungsform der Erfindung bildet diejenige DNA fehlgepaarte Hybride, deren Methylierungsstatus (methyliert bzw. unmethyliert) nachgewiesen werden soll. In den folgenden Schritten wird die Oligonukleotid-Komponente dieser Hybride dann enzymatisch geschnitten. Die Oligonukleotid Fragmente werden von der DNA getrennt

und anschließend detektiert. Aus dem Signal lässt sich auf den Methylierungsstatus der DNA schließen. Durch einen Überschuss an Oligonukleotiden lässt sich der Prozess wiederholen. Das Signal kann so amplifiziert werden (Midas-Verfahren, siehe ausführlich unten).

In einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens bildet die Hintergrund-DNA fehlgepaarte Hybride. Die DNA, deren Methylierungsstatus nachgewiesen werden soll, bilden dagegen Hybride ohne Fehlpaarung. Anschließend wird mit Hilfe eines Enzyms spezifisch die Hintergrund DNA geschnitten (anders dagegen das oben beschriebene Verfahren; dort wird die Oligonukleotidkomponente der fehlgepaarten Hybride geschnitten). Schließlich erfolgt ein Nachweis der nicht geschnittenen DNA. Welche Basenfehlpaarungen ausgenutzt werden, hängt auch in dieser Ausführungsform von der Spezifität der im nächsten Schritt verwendeten Enzyme ab (s.u.).

In dem dritten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Strang der fehlgepaarten Hybride enzymatisch geschnitten. Je nach Ausführungsform handelte es sich dabei um die Oligonuklotid- oder die DNA-Komponente (s.o.). Die eingesetzten Enzyme müssen in der Lage sein, die oben beschriebenen Fehlpaarungen zu erkennen und die Hybride an diesen Stellen zu schneiden. Hierfür eignen sich insbesondere DNA-Reparaturenzyme. Dabei handelt es sich zu meist um DNA-Glykosylasen, die die glykosidische Bindung zwischen der Base und dem Zucker-Phosphatrückgrat spalten. Oft besitzen die DNA-Glykosylasen gleichzeitig eine Apurin/Apyrimdin (AP)-Lyase-Aktivität, die zu einer Spaltung des Rückgrats führt (zur Übersicht: Memisoglu and Samson: Base excision repair in yeast and mammals. Mutat Res. 2000 Jun 30;451(1-2):39-51). Für das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere das TDG-Protein. Hierbei handelt es sich um eine Thymin-DNA-Glykosylase,

die T<->G-Fehlpaarungen erkennt und nur den Strang mit dem T spaltet. Auch thermostabile Varianten des TDG-Protein sind bekannt (Horst and Fritz: Counteracting the mutagenic effect of hydrolytic deamination of DNA 5-methylcytosine residues at high temperature: DNA mismatch N-glycosylase *Mig*. *Myth of the thermophilic archaeon Methanobacterium thermoautotrophicum* *EMBO J.* 1996 Oct 1;15(19):5459-69). Für das erfindungsgemäße Verfahren ist weiterhin besonders geeignet die MutY DNA-Glykosylase.

10 Dieses Enzym erkennt spezifisch A<->G-Fehlpaarungen und spaltet nur den A-Strang (vgl.: Lu and Hsu: Detection of single DNA base mutations with mismatch repair enzymes. *Genomics.* 1992 Oct;14(2):249-55). Ein weiteres besonders geeignete Enzym ist das Mug-Protein. Dieses erkennt spezifisch U<->G-Fehlpaarungen (vgl.: Lutsenko and Bhagwat: The role of the *Escherichia coli* mug protein in the removal of uracil and 3,N(4)-ethenocytosine from DNA. *J Biol Chem.* 1999 Oct 22;274(43):31034-8). Alle drei genannten Enzyme sind kommerziell erhältlich (Trevigen Inc., 8405

20 Helgerman Court, Gaithersburg, MD 20877 USA; [www.trevigen.com](http://www.trevigen.com)). Zum Stand der Technik gehören eine Vielzahl weiterer Reparaturenzyme (siehe etwa: Wood et al.: Human DNA repair genes. *Science.* 2001 Feb 16;291(5507):1284-9; US 5,656,430). Dem Fachmann ist bekannt, dass Reparaturenzyme, die nicht in der Lage sind, das Zucker-Phosphat-Rückgrat zu spalten, auch in Kombination mit Lyasen oder Endonukleasen eingesetzt werden können (vgl.: Bazar et al a.a.o 1999; US 5,656,430, Spalte 5 Z 23 ff). Es ist ebenfalls bekannt, dass AP-Positionen

30 auch physikalisch oder durch Umsatz mit Chemikalien, etwa mit NaOH gespalten werden können (vgl.: Horst and Fritz a.a.o., 1996). Wird die enzymatisch behandelte DNA später amplifiziert, so ist es zudem denkbar, die AP-Positionen ohne weitere Behandlung einzusetzen. Denn es ist zu erwarten, dass eine Amplifikation der abasischen DNA nur

35 eingeschränkt erfolgt. Zudem schließt das erfindungsgemä-

ße Verfahren Ausführungsformen mit ein, in denen beide Stränge des fehlgepaarten Hybrids geschnitten werden.

5 Im vierten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die ungeschnittene DNA oder die geschnittenen Fragmente nachgewiesen. Je nach vorherigem experimentellen Aufbau sind hier unterschiedliche Ausführungsformen möglich. In der Midas-Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt ein Nachweis der geschnittenen Oligonukleotidfragmente. Dem Fachmann sind hier eine Vielzahl von  
10 technischen Detektionsmöglichkeiten geläufig, etwa über Gel- oder Kapillarelektrophore oder über Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET, vgl.:US 5,656,430).

15 In Ausführungsformen, in denen die Reparaturenzyme eingesetzt werden, um die Hintergrund-DNA zu entfernen, kann die ungeschnittenen DNA anhand der gängigen molekularbiologischen Verfahren analysiert werden, etwa über Hybridisierung oder Sequenzierung. Bevorzugt wird die umgewandelte DNA zunächst mit einer Polymerasekettenreaktion  
20 amplifiziert (s.u.). Besonders bevorzugt verlaufen Einsatz des Reparaturenzyms und Amplifikation parallel. Dies ist etwa bei Verwendung thermostabiler Enzyme möglich (s.u.).

25 Im fünften Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird aus dem Signal auf den Methylierungsstatus der untersuchten DNA geschlossen. Dies geschieht je nach vorherigem experimentellen Vorgehen nach dem Stand der Technik.

30

Im folgenden sind besondere Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens beschrieben.

In einer ersten besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt das erfindungsgemäße Verfahren ähnlich zu dem bereits in der Mutationsanalyse eingesetzten Midas-Verfahren (Bazar et al., a.a.o. 1999; US 5,656,430). Diese Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass folgende Schritte ausgeführt werden:

- a) die zu untersuchende DNA wird chemisch oder enzymatisch so umgesetzt, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,
- b) die umgewandelte DNA wird mit Oligonukleotiden hybridisiert, wobei die nachzuweisende DNA Hybride mit Basenfehlpaarungen bildet,
- c) der Oligonukleotid-Strang der fehlgepaarten Hybride wird enzymatisch geschnitten,
- d) die geschnittenen Oligonukleotid-Fragmente werden nachgewiesen,
- e) aus dem Signal wird auf den Methylierungsstatus der untersuchten DNA geschlossen.

In dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die zu untersuchende DNA zunächst wie oben beschrieben chemisch oder enzymatisch vorbehandelt. Bevorzugt erfolgt eine Bisulfitbehandlung. Durchführungsweise und Reaktionsbedingungen sind dem Fachmann bekannt (vgl.: Frommer et al., a.a.o. 1992; Olek et al., a.a.o. 1996; DE 10029915; DE 10029915). Danach kann eine Amplifikation der DNA erfolgen. Die umgewandelte DNA wird anschließend an Oligonukleotide hybridisiert, wobei die nachzuweisende (methylierte bzw. unmethylierte) DNA fehlgepaarte Hybride bildet. In den folgenden Schritten wird die Oligonukleotidkomponente dieser Hybride enzymatisch geschnitten. Anschließend werden die Oligonukleotid-Fragmente von der DNA getrennt und detektiert. Aus dem Signal lässt sich



dann auf den Methylierungsstatus der DNA schließen. Durch einen Überschuss an Oligonukleotiden lässt sich der Prozeß wiederholen. Das Signal kann so amplifiziert werden.

5 Die Reaktionskomponenten und Reaktionsbedingungen entsprechen denen für die Mutationsanalyse beschriebenen (Bazar et al., a.a.o.1999; US 5,656,430). So sind die Oligonukleotidsonden bevorzugt zwischen 20 und 50 Nukleotide lang. Die Oligonukleotidsonden tragen bevorzugt  
10 Farbstoffe oder andere nachweisbare Markierungen, die eine spätere Detektion erleichtern. Die Fehlpaarungen und die Enzyme müssen so ausgewählt sein, dass nur die Oligonukleotidkomponenten der Hybride geschnitten werden. Dabei ist zu beachten, dass bei der Bisulfitumwandlung unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt wird, während Methylcytosin unverändert bleibt. Als mögliche Fehlpaarungen stehen daher für den Nachweis eines unmethylierten Strangs U $\leftrightarrow$ G und für den Nachweis eines methylierten Strangs C $\leftrightarrow$ A zur Verfügung. Dementsprechend müssen die  
15 eingesetzten Oligonukleotide entweder ein G oder ein A tragen. Die verwendeten Enzyme schneiden entweder ein G an einer U $\leftrightarrow$ G-Fehlpaarung oder ein A an einer C $\leftrightarrow$ A-Fehlpaarung. Wird die zu untersuchende DNA nach der Bisulfitbehandlung zunächst amplifiziert, so können auch  
20 T $\leftrightarrow$ G, A $\leftrightarrow$ C oder G $\leftrightarrow$ T Fehlpaarungen ausgenutzt werden (s.o.). Dabei tragen die Oligonukleotide ein G, C oder T. Ein Schnitt einer G $\leftrightarrow$ T-Fehlpaarung am T ist etwa durch den Einsatz des kommerziell erhältlichen TDG-Enzyms möglich (s.o.).

30 Die Hybridisierung der Oligonukleotidsonden an die DNA erfolgt bevorzugt unter stringenten Bedingungen. Die Reaktionsparameter sind vorzugsweise so gewählt, dass die Bindung der Sonde an die DNA nach dem enzymatischen  
35 Schnitt thermodynamisch instabil wird, so dass die geschnittenen Fragmente von der DNA abfallen. Diese Bindungsstellen können dann von noch unverbrauchte Sonden

dungsstellen können dann von noch unverbrauchte Sonden besetzt werden. Gleichwohl sind auch Ausführungsformen möglich, in denen ein Fragment der Sonde an der DNA gebunden bleibt und etwa mit markierten Oligonukleotiden verlängert wird (vgl.: US 5,656,430). Es gehört zudem zum Stand der Technik, helixdestabilisierender Moleküle einzusetzen. Auch ist bekannt, dass der Einsatz hitzestabiler Reparaturenzyme die Sensitivität des Verfahrens erhöht (Bazar et al., a.a.o.1999; US 5,656,430).

Im letzten Schritt dieser Ausführungsform erfolgt ein Nachweis der geschnittenen Oligonukleotidfragmente. Dem Fachmann sind hier eine Vielzahl von technischen Detektionmöglichkeiten geläufig, etwa über Gel- oder Kapillarelektrophore oder über Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET, vgl.:US 5,656,430).

In US 5,656,430 sind weitere Verfahrenvariationen des Midas-Verfahrens zur Mutationsanalyse beschrieben. Diese Ausführungsformen sind entsprechend zur Methylierungsanalyse anwendbar sind und sind daher auch Teil dieser Erfindung.

Eine andere besonders bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens nutzt die Bildung von fehlgepaarten Hybride vor allem aus, um die Hintergrund-DNA zu entfernen. Diese Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass

- a) die zu untersuchende DNA chemisch oder enzymatisch so umgesetzt wird, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,
- b) die umgewandelte DNA mit Oligonukleotiden hybridisiert wird, wobei die Hintergrund-DNA Hybride mit Basenfehlpaarungen bildet,

- c) der DNA-Strang der fehlgepaarten Hybride enzymatisch geschnitten wird,
- d) die ungeschnittene DNA nachgewiesen wird,
- e) aus dem Signal auf den Methylierungsstatus der untersuchten DNA geschlossen wird.

Auch in dieser Ausführungsform wird die nachzuweisende DNA zunächst enzymatisch oder chemisch vorbehandelt. Bevorzugt wird eine Bisulfit-Umwandlung durchgeführt (s.o.). Die Oligonukleotide binden anschließend an die nachzuweisende DNA ohne Fehlpaarung. Die Hintergrund-DNA bildet dagegen fehlgepaarte Hybride, die anschließend mit Hilfe eines Enzyms spezifisch geschnitten werden. Die ungeschnittene DNA wird anschließend bevorzugt amplifiziert. Die Amplifikate werden nachgewiesen, und aus dem Signal wird auf den Methylierungsstatus der DNA geschlossen.

Die Oligonukleotide tragen bevorzugt zwischen 10 und 100, besonders bevorzugt zwischen 20 und 50 Nukleotide. In besonderen Ausführungsformen der Erfindung dienen die Oligonukleotide gleichzeitig als Primer oder Sonden in einer anschließenden Amplifikation (s.u.). Werden die Oligonukleotide nicht als Primer eingesetzt, so sind sie bevorzugt so aufgebaut, dass sie nicht von einer in der Amplifikation eingesetzten Polymerase verlängert werden können. Dies geschieht etwa durch den Einsatz von 3'-Desoxyoligonukleotiden oder von an der 3'-Position anderweitig funktionalisierten Oligonukleotiden, beispielsweise 3'-O-Acetyloligonukleotiden. Zudem sind die Oligonukleotide bevorzugt so aufgebaut, dass sie im Zuge der Amplifikation nicht von der Polymerase degradiert werden. Dies kann etwa durch Thioatbrücken am 5'-Ende erfolgen. Eine andere Möglichkeit ist es, Polymerasen zu verwenden, die über keine Nukleaseaktivität verfügen. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung dient das Oligonukleotid allerdings als sog. Taqman-Sonde. Ein Ab-

nukleotid allerdings als sog. Taqman-Sonde. Ein Abbau der Sonde durch die Polymerase muss hier gerade gewährleistet sein (s.u.).

- 5 Die Oligonukleotide werden bevorzugt in Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{mol/l}$  bis 10  $\mu\text{mol/l}$  eingesetzt. Die Konzentrationen der übrigen Komponenten sind bevorzugt so gewählt, dass sie denen der nachfolgenden Amplifikation entsprechen (etwa: 50-100  $\text{mmol/l}$  KCl, 10  $\text{mmol/l}$  Tris; 1,5-5
- 10  $\text{mmol/l}$   $\text{Mg}^{2+}$ , pH 8,5-9,0). Die Hybridisierungsbedingungen sind im übrigen so gewählt, dass eine spezifische Hybridisierung unter Bildung der gewünschten Fehlpaarungen erfolgt. Einzelheiten zur Bestimmung von Hybridisierungsbedingungen sind dem Fachmann bekannt. Zum Stand der Technik gehört etwa auch die Verwendung von Oligonukleotiden, die einen sog. „Minor Groove“-Binder tragen (ABI). Eine spezifische Bindung auch kurzer Oligonukleotide ist damit möglich.
- 15
- 20 In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Oligonukleotide mehrere methylierungsspezifische Positionen, so dass es bei der Hybridbildung mit der Hintergrund-DNA zu mehreren Basenfehlpaarungen kommt. Hierdurch wird die Wahrscheinlichkeit, dass die Hintergrund-DNA geschnitten
- 25 wird, erhöht.
- Bevorzugt schneiden die eingesetzten Reparaturenzyme nur die DNA-Komponente der Hybride. Gleichwohl umfasst diese Anmeldung auch Ausführungsformen, in denen beide Hybrid-
- 30 stränge gespalten werden. Als mögliche Basenfehlpaarungen stehen wie oben beschrieben U $\leftrightarrow$ G und C $\leftrightarrow$ A, bzw. nach einer Amplifikation auch T $\leftrightarrow$ G, A $\leftrightarrow$ C oder G $\leftrightarrow$ T zur Verfügung. Die eingesetzten Enzyme müssen in der Lage sein, diese Fehlpaarungen zu erkennen und die DNA-Komponente an
- 35 diesen Stellen zu schneiden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das TDG-Enzym eingesetzt, das T $\leftrightarrow$ G-

Fehlpaarungen an der T-Position schneidet (s.o.). In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird das Mug-Protein eingesetzt, das U<->G-Fehlpaarungen an der U-Position schneidet.

5

10

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Hybridisierung und der Einsatz der Reparaturenzyme vor der Amplifikation der DNA. Dieses Verfahren ist insbesondere geeignet, wenn keine thermostabilen Varianten der Reparaturenzyme zur Verfügung stehen. Die Reaktionsbedingungen sind so zu wählen, dass ein möglichst vollständiger Abbau der Hintergrund-DNA gewährleistet ist. Einzelheiten sind dem Fachmann bekannt und ergeben sich etwa aus den von den Herstellern mitgelieferten Protokollen.

15

20

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform verlaufen der Einsatz des Reparaturenzyms und die Amplifikation parallel. Dies ist etwa bei Verwendung thermostabiler Enzyme möglich (s.u.). Thermostabile Varianten des TDG-Enzyms sind bekannt und kommerziell erhältlich (Horst and Fritz a.a.o. 1996, Trevigen Inc., 8405 Helgerman Court, Gaithersburg, MD 20877 USA; [www.trevigen.com](http://www.trevigen.com)). Eine solche Parallelisierung führt zu einer Zeitersparnis und erleichtert eine Automatisierbarkeit. Zudem wird die Gefahr falsch-positiver Resultate verringert. Denn eventuell unspezifisch amplifizierte Hintergrund-DNA wird dem Amplifikationsprozess sofort entzogen. Bei einer reinen Präinkubation mit den Reparaturenzymen ist dagegen denkbar, dass die enzymatische Degradation nicht vollständig verläuft. Nicht abgebaute Hintergrund-DNA kann dann amplifiziert werden und so zu falsch-positiven Resultaten führen.

25

30

Der Nachweis der nicht geschnittenen DNA erfolgt vorzugsweise über eine Amplifikation. Wenn ein unvollständiger Abbau der Hintergrund-DNA nicht auszuschließen ist, erfolgt die Amplifikation und/oder Detektion der DNA methylierungsspezifisch, d.h. unter Einsatz von methylierungsspezifischen Primern, Blockern oder Sonden. Die Spezifität des Nachweises wird so noch einmal erhöht, und die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse kann so weiter verringert werden. Methylierungsspezifische Amplifikationen und Detektionen gehören zum Stand der Technik (MSP, Heavy-Methyl, Methyl-Light, Nachweise s.o.).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die Oligonukleotide und die Primer der anschließenden (methylierungsspezifischen) Amplifikation identisch. Diese Variante ähnelt dem bekannten MSP-Verfahren (s.o.). Spezifität und Anwendungsbereich sind jedoch höher als bei der MSP-Methodik. Bisher ist es für diagnostische Anwendungen des MSP-Verfahren oft erforderlich, Primer mit mindestens drei methylierungsspezifischen Positionen einzusetzen. Nur so ist sichergestellt, dass es nicht zu einer unspezifischen Verlängerung der fehlgepaarten Primer und somit zu falsch-positiven Signalen kommt. Diese Sequenzanforderungen und die Notwendigkeit einer Comethylierung der untersuchten Positionen schränken die Anwendbarkeit des Verfahrens ein. In der erfindungsgemäßen Variante wird eine unspezifische Verlängerung fehlgepaarter Primer durch den Einsatz der Reparaturenzyme verhindert. Denn die fehlgepaarten Positionen werden durch die Reparaturenzyme spezifisch abgebaut. Wird das Zucker-Phosphat-Rückgrat an der Fehlpaarungsposition geschnitten, so steht die Hintergrund-DNA für eine Amplifikation nicht mehr zur Verfügung. Für eine methylierungsspezifische

Amplifikation sind daher weniger methylierungsspezifische Positionen erforderlich.

Für diese Ausführungsform findet bevorzugt eine Präinkubation mit dem Reparaturenzym statt. Enthält der Reaktionsansatz bereits die DNA-Polymerase für die anschließende Amplifikation, so muss sichergestellt sein, dass es während der Präinkubation nicht zu einer unspezifischen Verlängerung der fehlgepaarten Primer kommt. Dies ist etwa durch den Einsatz einer „HotStart“-Polymerase möglich, die erst durch einem Erhitzungsschritt aktiviert wird (vgl.: Birch et al., "Simplified hot start PCR", Nature. 1996 May 30;381(6581):445-6).

Neben einer Präinkubation ist es auch denkbar, den Einsatz des Reparaturenzyms und die Amplifikation zu parallelisieren. Auch hier muss jedoch eine unspezifische Amplifikation der fehlgepaarten Primer ausgeschlossen werden. Dies ist etwa möglich, wenn Polymerasen zur Verfügung stehen, deren Aktivität erst ab einer erhöhten Temperatur beginnt. Zudem muss ein zusätzlicher Schritt in das PCR-Temperaturprofil integriert werden. Im Zuge des Temperaturzyklus wird dann zunächst bei einer geringen Temperatur ein Annealing des Primers an die DNA unter Bildung von Fehlpaarungen ermöglicht. Bei dieser Temperatur degradiert das Reparaturenzym die Hintergrund-DNA; die Polymerase ist allerdings noch inaktiv. Anschließend wird die Temperatur erhöht. Die fehlgepaarten Primer werden dann von der DNA getrennt, und die Polymerase verlängert die spezifisch gebundenen Primer.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die Oligonukleotide so aufgebaut, dass sie in der anschließenden Amplifikation gleichzeitig als Detektionssonden dienen können. Bevorzugt werden dabei Sondenformate verwendet, die eine Real-Time-Detektion ermöglichen, etwa

Tagman-, Lightcycler oder Molecular Beacon-Sonden. Um falsch-positive Signale zu verhindern, muss sichergestellt werden, dass die Bildung der fehlgepaarten Hybride und die methylierungsspezifische Detektion der Sonden zeitlich unabhängig voneinander erfolgen. Dies gilt insbesondere bei Verwendung einer Tagman-Sonde, bei der die Signalbildung über den Abbau der Sonde durch die Polymerase erfolgt. Hier muss gewährleistet werden, dass die Polymerase nicht bereits während des Einsatzes des Reparaturenzyms aktiv ist. Dies kann bei einer Präinkubation durch Verwendung einer „HotStart“-Polymerase (s.o.) geschehen. Eine Parallelisierung von Fehlpaarungs-Abbau und Amplifikation ist bei Einsatz einer Tagman-Sonde nur möglich, wenn Polymerasen zur Verfügung stehen, deren Aktivität erst ab einer erhöhten Temperatur beginnt (s.o.). Bei Verwendung von Lightcycler- und Molecular Beacon-Proben ist dagegen ausreichend, wenn während der Amplifikation mit mehrstufigen Temperaturprofilen gearbeitet wird. Dabei erfolgt zunächst bei einer geringen Temperatur ein Annealing der Sonde an die DNA unter Bildung von Fehlpaarungen. Bei dieser Temperatur degradiert das Reparaturenzym die Hintergrund-DNA. Anschließend wird die Temperatur erhöht. Die fehlgepaarten Sonden werden dann von der DNA getrennt. Es erfolgt eine Amplifikation der DNA und eine Detektion der spezifisch gebundenen Sonden. Die Erfindung schließt Kombinationen der oben genannten Ausführungsformen mit ein. So können insbesondere methylierungsspezifischer Primer und Sonden verwendet werden, die gleichzeitig als Fehlpaarungssonden dienen.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist es, mehrere Fragmente gleichzeitig mittels einer Multiplex-PCR zu amplifizieren. Bei deren Design muss darauf geachtet werden, dass nicht nur die Primer, sondern auch



die weiteren eingesetzten Oligonukleotide nicht zueinander komplementär sein dürfen, so dass eine hochgradige Multiplexierung in diesem Fall schwieriger ist als in üblich. Jedoch hat man bei der chemisch oder enzymatisch vorbehandelten DNA den Vorteil, dass aufgrund des unterschiedlichen G und C-Gehaltes der beiden DNA-Stränge ein Forward-Primer niemals auch als Reverse-Primer fungieren kann, was die Multiplexierung wiederum erleichtert und den oben beschriebenen Nachteil im wesentlichen ausgleicht. Die Detektion der Amplifikate ist wiederum über unterschiedliche Verfahren möglich. Denkbar ist dabei etwa die Verwendung von Real-Time-Varianten. Für Amplifikationen von mehr als vier Genen empfiehlt es sich aber, die Amplifikate auf andere Weise zu detektieren. Bevorzugt ist dabei eine Analyse über Arrays (s.u.).

In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Reparaturenzyme in einer Mikroarray-basierten Methylierungsanalyse eingesetzt. Die Mikroarray-basierte Methylierungsanalyse gehört zum Stand der Technik (vgl.: Adorjan et al.: Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. Nucleic Acids Res. 2002 Mar 1;30(5):e21). Dabei wird die zu untersuchende DNA zunächst bisulfitiert und mittels einer PCR amplifiziert. Anschließend werden die Amplifikate an Oligonukleotide hybridisiert, die auf einer Chip-Oberfläche immobilisiert sind. Zwei unterschiedliche Arten von Oligonukleotiden werden dabei eingesetzt: Oligonukleotide, die CG-Dinukleotide tragen (Nachweise des methylierten Status) und Oligonukleotide, die TG-Dinukleotide (Nachweis des unmethylierten Status) tragen. Eine Problem bei der Chipanalyse ist, dass es durch unspezifische Hybrid-

sierungen zu falschen Ergebnissen kommen kann. Erfindungsgemäß werden bei der Hybridisierung Reparaturenzyme eingesetzt, die gerade die fehlgepaarte DNA entfernen. Die Spezifität der chipbasierten Methylierungsanalyse  
5 kann so erhöht werden.

Die oben beschriebenen Ausführungsformen sind dadurch gekennzeichnet, dass die Basenfehlpaarungen genau an den Positionen auftreten, die auf ihren Methylierungsstatus  
10 untersucht werden sollen. Demnach bilden sich bei der Hybridisierung entweder Hybride mit oder ohne Basenfehlpaarungen. In einer prinzipiell anderen Ausführungsform werden die Basenfehlpaarungen außerhalb der zu untersuchenden Positionen gebildet. Je nach Methylierungsstatus  
15 der DNA bilden sich dann entweder Hybride mit Basenfehlpaarungen oder keine Hybride.

Diese zweite Ausführungsform zur Analyse von Cytosin-Methylierungen ist demnach dadurch gekennzeichnet, dass

- 20 a) die zu untersuchende DNA chemisch oder enzymatisch so umgesetzt wird, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,
- 25 b) die umgewandelte DNA mit Oligonukleotiden hybridisiert wird, wobei die DNA des einen Methylierungsstatus Hybride mit Basenfehlpaarungen bildet, während die DNA des anderen Methylierungsstatus keine Hybride bildet.
- 30 c) ein Strang der fehlgepaarten Hybride enzymatisch geschnitten wird,
- d) die ungeschnittene DNA oder die geschnittenen Fragmente nachgewiesen werden,
- e) aus dem Signal auf den Methylierungsstatus der un-  
35 tersuchten DNA geschlossen wird.

Die zu untersuchende DNA wird dabei wie oben beschrieben  
zunächst enzymatisch oder chemisch umgesetzt. Um eine me-  
thylierungsspezifische Hybridisierung zu erreichen, müs-  
5       sen die eingesetzten Oligonukleotide über methylier-  
          rungsspezifische Dinukleotide (CG, TG oder CA) verfügen.  
Diese Oligonukleotide binden spezifisch dann nur an me-  
thylierte oder an unmethylierte DNA. Daneben tragen die  
Oligonukleotide außerhalb der zu untersuchenden Positio-  
10       nen eine Base, die bei Hybridisierung mit der zu analy-  
          sierenden DNA zu einer Fehlpaarung führt. Die Hybridisie-  
          rungsbedingungen sind dabei so gewählt, dass eine Hybrid-  
          bildung nur mit der DNA eines Methylierungsstatus er-  
          folgt. Dieses Hybrid trägt dann eine Fehlpaarung. Die DNA  
15       des anderen Methylierungszustandes bildet dagegen unter  
          den gewählten Hybridisierungsbedingungen keine Hybride.  
Um eine solche spezifische Hybridisierung zu gewährleis-  
ten, werden bevorzugt Oligonukleotide eingesetzt, die  
mindestens 3, vorzugsweise 4-6 methylierungsspezifische  
20       Dinukleotide tragen. Die Oligonukleotide sind dabei be-  
          vorzugt zwischen 20-40 Nukleotide lang. Hybridisierungs-  
          bedingungen, die die Ausbildung einer Fehlpaarung tole-  
          rieren, die Formierung von weiteren Fehlpaarungen an den  
          methylierungsspezifischen Positionen aber nicht erlauben,  
25       gehören zum Stand der Technik. Der Fachmann kann sie  
          leicht über Computerprogramme oder über Standardversuche  
          ermitteln. Diese Ausführungsform hat gegenüber den oben  
          beschriebenen Varianten den Vorteil, dass beliebige Fehl-  
          paarungen in die Hybride eingeführt werden können. Eine  
30       Beschränkung auf U<->G, C<->A, T<->G, A<->C oder G<->T-  
          Fehlpaarungen (s.o.) besteht nicht mehr. Somit erhöht  
          sich auch die Anzahl der einsetzbaren Enzyme. Informatio-  
          nen zu verwendbaren Reparaturenzymen findet dem Fachmann  
          etwa bei Wood et al (a.a.o. 2001). Prinzipiell möglich  
35       ist es auch, Oligonukleotide zu verwenden, die chemisch  
          modifizierte Basen tragen, die von den Reparaturenzymen

erkannt werden. Denkbar ist dabei sogar, dass die modifizierten Basen in den Hybriden keine Fehlpaarungen bilden, und die Erkennung durch die Reparaturenzyme allein aufgrund der chemischen Modifikation erfolgt. Eine solche Variante hätte den Vorteil, dass eine Hybridisierung unter sehr spezifischen Bedingungen erfolgen kann. Für die Ausführungsformen, in denen die DNA-Komponenten der Hybride geschnitten werden, müssen allerdings Enzyme zur Verfügung stehen, die den DNA-Strang schneiden.

Auch diese zweite prinzipielle Ausführungsform kann in unterschiedlichen Varianten durchgeführt werden. In einer Variante bilden die Oligonukleotide mit derjenigen DNA Hybride, deren Methylierungsstatus nachgewiesen werden soll. Anschließend werden die Oligonukleotidkomponenten der Hybride geschnitten und die Fragmente nachgewiesen (s.o.). In einer anderen Variante binden die Oligonukleotide nur an die Hintergrund-DNA. Anschließend wird die Hintergrund-DNA durch die Reparaturenzyme geschnitten. Bevorzugt wird die nachzuweisende DNA dann amplifiziert und schließlich detektiert. Vorzugsweise erfolgt hierbei der Einsatz der Reparaturenzyme vor der Amplifikation der DNA. Dieses Verfahren ist insbesondere geeignet, wenn keine thermostabilen Varianten der Reparaturenzyme zur Verfügung stehen. Die Reaktionsbedingungen sind so zu wählen, dass ein möglichst vollständiger Abbau der Hintergrund-DNA gewährleistet ist (s.o.). Stehen thermostabile Reparaturenzyme zur Verfügung, so ist es bevorzugt, den Einsatz des Reparaturenzyms und die Amplifikation zu parallelisieren (s.o.).

In einer besonders bevorzugten Variante dieser Ausführungsform wird eine methylierungsspezifische Amplifikation mit Hilfe von Blockeroligonukleotiden durchgeführt (sog. „Heavy Methyl“-Verfahren, s.o.). Die eingesetzten

Fehlpaarungs-Oligonukleotide sind dabei mit den Blockeroligonukleotiden identisch. Somit kann auf zweifache Weise verhindert werden, dass es über eine unspezifische Amplifikation der Hintergrund DNA zu falsch-positiven Ergebnissen kommt. Technische Details zum Aufbau der Blockeroligonukleotide und zur Durchführung des Heavy-Methyl-Verfahrens sind dem Fachmann bekannt (vgl.: WO 02/072880).

Ein weiterer Aspekt der Erfindung besteht in der Verwendung aller erfindungsgemäßen Ausführungsformen. Werden krankheitsspezifische Cytosinpositionen untersucht, so eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere zur Diagnose oder Prognose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten. Hierzu gehören u.a. CNS-Fehlfunktionen, Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich außerdem zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen, zur Festlegung einer spezifischen Arzneimittel-

therapie (personalisierte Medizin) und zur Überwachung des Erfolges einer Arzneimitteltherapie. Eine weitere Anwendung ist die Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben und die Untersuchung der Zelldifferenzierung.

5

Schließlich ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung auch ein Kit, bestehend aus mindestens einer Oligonukleotidsonde und einem Reparaturenzym sowie optional einer Polymerase und weiteren für eine PCR erforderlichen Reagenzien.

10

### Beispiele

Beispiel 1: Methylierungsspezifische Amplifikation nach einem spezifischen Abbau von unmethylierter Templat-DNA durch das *E.coli* Mug-Protein

15

Mittels PCR wird eine Sequenz des *brca1*- Gens des humanen Genoms (SeqID-8, nt 3538 bis nt 3666 in Genbank Accession L78833.1) amplifiziert. Als Templat dient bisulfit-konvertierte humane DNA, die aus peripherem Blut gewonnen sowie mittels Sss1-Methylase (Serologicals) universell methyliert wurde. Als nicht methylierte Hintergrund-DNA wurde ebenfalls aus peripherem Blut gewonnene humane DNA verwendet (Roche Diagnostics). Von dieser ist bekannt, dass die zu amplifizierende Sequenz des *brca1*-Gens nicht methyliert vorliegt. Somit kann ein Gemisch aus methylierter und nicht methylierter bisulfit-konvertierter DNA hergestellt werden. Die Bisulfit-Konversion wurde durchgeführt wie bei Olek et al (a.a.o.) beschrieben. In dieser chemischen Reaktion werden alle Cytosinbasen in Uracilbasen umgewandelt, während 5-Methylcytosin nicht umge-

20

25

30

setzt wird. Wegen der identischen Basenpaarungseigenschaften von Uracil und Thymin werden diejenigen Positionen, die den umgewandelten, nicht methylierten Cytosinen entsprechen, mit einem kleinen „t“ gekennzeichnet (bzw. kleines „a“ im komplementären Strang). Dagegen stehen das große „T“ (bzw. „A“ im komplementären Strang) für die bereits vor der Bisulfit-Behandlung vorhandenen Thymine. Die in diesem Beispiel verwendeten Primer sind spezifisch für bisulfitkonvertierte DNA. Sie enthalten jedoch keine methylierungsspezifischen Sequenzen. Eine methylierungsabhängige Reaktion wird erst durch die Verwendung einer Mismatchsonde, die vom Mug-Protein erkannt wird, erzielt. Dazu wird dem Reaktionsansatz ein Oligonukleotid zugefügt, das sequenzspezifisch für das *brca1*-Gen ist. Dieses Oligonukleotid hybridisiert an das zu amplifizierende Fragment und überspannt dabei zwei CpG-Dinukleotide. Die Sequenz der Mismatchsonde ist so gewählt, dass sie bei 37°C sowohl an methylierter bisulfitkonvertierter DNA als auch an nichtmethylierter bisulfitkonvertierter DNA bindet. Die Hybridisierung an nichtmethylierter bisulfitkonvertierter DNA erfolgt dabei unter Bildung zweier U $\leftrightarrow$ G-Basenfehlpaarungen. Vor der PCR erfolgt eine 30-minütige Inkubation bei 37°C in der die U $\leftrightarrow$ G-Fehlpaarung vom *E.coli* Mug-Protein erkannt wird. Das Mug-Protein entfernt anschließend die Uracile aus der DNA (Lutsenko et al., 1999, a.a.o.). So entstehen in der nicht methylierten DNA zwei abasische Nukleotide. Unverändert bleibt hingegen die methylierte bisulfit-konvertierte DNA. Diese erzeugt mit der Hybridisierungssonde keine Basenfehlpaarung und stellt daher kein Substrat für das Mug-Protein dar. In einem 10-minütigen Aktivierungsschritt für die DNA-Polymerase bei 95°C werden die abasischen Regionen der

vormals nicht methylierten DNA teilweise hydrolytisch gespalten. Die Verwendung der Mismatchsonde und des Mug-Proteins führt also zu einem spezifischen Abbau nicht methylierter DNA. Man kann davon ausgehen, dass die hydrolytische Spaltung unter den gewählten Bedingungen nur unvollständig abläuft. Dennoch steht die nicht methylierte DNA nicht mehr als Templat für die PCR zur Verfügung, da die erzeugte abasische Region von der Polymerase nicht abgelesen werden kann. Aus einer DNA-Probe können also nur dann PCR-Produkte erzeugt werden, wenn sie einen gewissen Anteil an DNA enthält, die in der Region der Mismatchsonde methyliert vorliegt. Der Reaktionsansatz wird im LightCycler-1.3 System in den dafür vorgesehenen Kapillaren durchgeführt.

Im 20 µl Reaktionsvolumen sind enthalten (Sequenzen in Tabelle 2): 10 µl Templat-DNA (Tabelle 1), 2 µl FastStart LightCycler Mix für Hybridisierungssonden (Roche Diagnostics), 2,0 mmol/l MgCl<sub>2</sub> (Roche Diagnostics), 0,30 µmol/l Forwardprimer (SeqID-1, TIB-MolBiol, Berlin), 0,30 µmol/l Reverseprimer (SeqID-2, TIB-MolBiol), 0,15 µmol/l Sonde 1 (SeqID-3, TIB-MolBiol), 0,15 µmol/l Sonde 2 (SeqID-4, TIB-MolBiol), 1 Unit Mug-Protein (Trevigen), 1 µmol/l Mismatchsonde (SeqID-5, TIB-MolBiol).

Folgendes Temperaturprogramm wird eingesetzt: Vorinkubation mit Mug-Protein: 40 min bei 37°C; Aktivierung der Polymerase: 10 min bei 95°C; 55 Temperaturzyklen: 10 sec bei 95°C; 10 sec bei 56°C; 10 sec bei 72°C. Abschließend wird die Reaktion auf 35°C abgekühlt.

Die Fluoreszenzsignale werden im Kanal F2 gemessen. Die Auswertung der PCR erfolgt automatisch mittels der Light-



Cycler Software im Kanal F2/F1. Als positiv gelten Signale, die signifikant über dem Hintergrundsignal der Negativkontrollen liegen. Als Ergebnis wird erwartet, dass nur solche DNA-Mischungen positive Signale erzeugen, die methylierte bisulfit-konvertierte DNA enthalten. Die Signale sollten dabei unabhängig von der Menge an ursprünglicher nicht methylierter Hintergrund DNA sein. Die zu erwartenden Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt.

10 Beispiel 2. Methylierungsspezifische PCR durch Verwendung des thermostabilen TDG Proteins aus *Methanobacterium thermoautotrophicum THF*

Mittels PCR wird die gleiche wie in Beispiel 1 beschriebene DNA Sequenz amplifiziert. Als Templat-DNA wird die ebenfalls dort beschriebene bisulfit-konvertierte humane DNA verwendet. In diesem Anwendungsbeispiel wird dem PCR-Ansatz eine thermostabile Thymin-DNA- Glykosylase aus *Methanobacterium thermoautotrophicum THF* (TDG-Protein) zugesetzt (Horst et al., 1996 a.a.o.). Diese erkennt T<->G Fehlpaarungen und entfernt Thymin aus dem DNA-Doppelstrang. Die Guaninbasen bleiben erhalten. Im Reaktionsansatz befindet sich außerdem ein sequenzspezifisches Oligonukleotid (Mismatchsonde). Die Sequenz der Mismatchsonde ist dabei so gewählt, dass sie komplementär zu methylierter bisulfit-konvertierter DNA ist und mindestens ein CpG überspannt. Während der Annealingphase der PCR bindet die Mismatchsonde an die Templat-DNA. Die Hybridisierung an ehemals nicht-methylierte Templat-DNA und den daraus entstandenen Amplifikaten erfolgt dabei unter Bildung von T<->G Basenfehlpaarungen. Diese werden vom TDG-Protein erkannt und die Thymine aus der DNA ent-

fernt, so dass abasische Regionen entstehen. Diese DNA mit abasischen Regionen steht dann im nächsten PCR-Zyklus nicht mehr als Templat zur Verfügung, da sie von der DNA-Polymerase nicht abgelesen werden kann. Die Denaturierungsphasen der PCR dienen gleichzeitig zur teilweise hydrolytischen Spaltung der DNA an den abasischen Nukleotiden. Auch diese gespaltene DNA kann nicht mehr als Templat dienen. Da das TDG Protein thermostabil ist, bleibt es über längere Zeit aktiv und kann den spezifischen Abbau vormals nicht-methylierter DNA-Stränge über mehreren PCR-Zyklen katalysieren. Ursprünglich methylierte DNA hingegen wird nicht abgebaut, da sie mit der Mismatchsonde reguläre C:G Paarungen bildet. Über die Dauer der PCR werden vormals methylierte DNA und entsprechende Amplifikate angereichert. Als Endprodukt der PCR werden daher nur Sequenzen methylierter DNA erwartet. Aus einer DNA-Probe werden demnach nur dann PCR-Produkte erzeugt, wenn sie einen gewissen Anteil an DNA enthält, die in der Region der Mismatchsonde methyliert vorliegt. Der Vorteil dieser Methode gegenüber dem Anwendungsbeispiel 1 liegt darin, dass die Selektion zwischen ursprünglich methylierter und nicht-methylierter DNA nicht nur einmal, sondern in mehreren PCR-Zyklen stattfindet. Durch die Verwendung des thermostabilen TDG Proteins aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* THF wird also eine höhere relative Sensitivität der Reaktion erreicht. Das Temperaturprogramm enthält zwei zusätzliche Inkubationszyklen bei 56°C, um den Anteil nicht-methylierter DNA schon vor Beginn der PCR zu reduzieren. Der Reaktionsansatz wird im LightCycler-1.3 System in den dafür vorgesehenen Kapillaren durchgeführt.

Im 20 µl Reaktionsvolumen sind enthalten (Sequenzen in Tabelle 2): 10 µl of Templat-DNA, 2 µl of FastStart LightCycler Mix für Hybridisierungssonden (Roche Diagnostics), 2,0 mmol/l MgCl<sub>2</sub> (Roche Diagnostics), 0,30 µmol/l Forwardprimer (SeqID-1, TIB-MolBiol), 0,30 µmol/l Reverseprimer (SeqID-2, TIB-MolBiol); 0,15 µmol/l Sonde 1 (SeqID-3, TIB-MolBiol); 0,15 µmol/l Sonde 2 (SeqID-4, TIB-MolBiol), 1 Unit thermostabile TDG Glycosylase (Trevigen), 1 µmol/l Mismatchsonde (SeqID-6, TIB-MolBiol).

Folgendes Temperaturprogramm wird eingesetzt: 2 Temperaturzyklen: 10 sec bei 95°C; 5 min bei 56°C; Aktivierung der Polymerase: 10 min bei 95°C; 55 Temperaturzyklen: 10 sec bei 95°C; 10 sec bei 56°C; 10 sec bei 72°C; Abschließend wird die Reaktion auf 35°C abgekühlt.

Die Fluoreszenzsignale werden im Kanal F2 gemessen. Die Auswertung der PCR erfolgt automatisch mittels der LightCycler Software im Modus F2/F1. Als positiv gelten Signale, die signifikant über dem Hintergrundsignal der Negativkontrollen liegen. Als Ergebnis wird erwartet, dass nur solche DNA Mischungen positive Signale erzeugen, die methylierte bisulfit-konvertierte DNA enthalten. Die Signale sollten dabei unabhängig von der Menge an ursprünglicher nichtmethylierter Hintergrund DNA sein (Vgl.: Tabelle 1).

Beispiel 3: "Erhöhung der Sensitivität eines Heavy Methyl Assays durch Einsatz des thermostabilen TDG Proteins aus *Methanobacterium thermoautotrophicum THF*"

5 Mittels PCR wird die in Beispiel 1 beschriebene DNA Sequenz amplifiziert (Seq-ID 1, Seq-ID 2, Seq-ID 8). Als  
Templat-DNA wird die ebenfalls dort beschriebene bisulfitkonvertierte humane DNA aus gleicher Quelle verwendet. Im PCR Ansatz ist zusätzlich ein methylierungsspezifisches  
10 Blocker-Oligonukleotid (Seq-ID 7) enthalten. Dadurch wird eine methylierungsspezifische Amplifikation erreicht (s.o.). Die Sequenz des Blockers ist dabei so gewählt, dass er 3 CpGs überspannt und komplementär zu  
nicht methylierter bisulfitkonvertierter DNA ist. Im Gegensatz zum herkömmlichen "Heavy Methyl Assay" wurde im  
15 Blocker an der Position 10 ein Nukleotid ausgetauscht. Anstelle des Adenosin wurde Guanosin eingebaut, welches bei Hybridisierung des Blockers an die bisulfitkonvertierte DNA ein G<->T Fehlpaarungen bildet. Im PCR Ansatz  
ist zusätzlich das thermostabile TDG Proteins enthalten,  
20 welches G<->T Fehlpaarungen erkennt und die Thymin-Base aus der DNA entfernt, so dass abasische Regionen entstehen. Eine Vorinkubation des PCR-Ansatzes bei einer blocker-spezifischen Hybridisierungstemperatur führt somit  
zum spezifischen Abbau nicht methylierter bisulfitkonvertierter Templat DNA. Ein Abbau methylierter DNA wird da-  
25 durch verhindert, dass die Hybridisierung des Blockers methylierungsspezifisch erfolgt. Während der PCR fungiert der Blocker weiterhin als Blockeroligonukleotid. Da das  
thermostabile TDG Protein aktiv bleibt, wird jedoch zu-  
sätzlich in jedem weiteren PCR-Zyklus nicht methylierte  
30 DNA abgebaut. Im Gegensatz zum herkömmlichen "Heavy Methyl Assay" wird also sowohl die Amplifikation nicht me-

thylierter DNA durch ein Blockeroligonukleotid verhindert, sondern zusätzlich nicht methylierte bisulfitkonvertierte DNA abgebaut. Durch die Kombination der Heavy Methyl-Technologie mit dem Fehlpaarungs-spezifischen Abbau durch das TDG Protein wird eine wesentliche Erhöhung der relative Sensitivität erzielt.

Das Temperaturprogramm enthält zwei zusätzliche Inkubationszyklen bei 56°C um den Anteil nicht methylierter DNA schon vor Beginn der PCR zu reduzieren. Der Reaktionsansatz wird im LightCycler-1.3 System in den dafür vorgesehenen Kapillaren durchgeführt.

Im 20 µl Reaktionsvolumen sind enthalten (Sequenzen in Tabelle 2): 10 µl of Templat-DNA; 2 µl FastStart LightCycler Mix für Hybridisierungssonden (Roche Diagnostics); 2,0 mmol/l MgCl<sub>2</sub> (Roche Diagnostics); 0,30 µmol/l Forwardprimer (SeqID-1, TIB-MolBiol); 0,30 µmol/l Reverseprimer (SeqID-2, TIB-MolBiol); 0,15 µmol/l Probe 1 (SeqID-3, TIB-MolBiol); 0,15 µmol/l Probe 2 (SeqID-4, TIB-MolBiol); 1 Unit thermostabile TDG Glycosylase (Trevigen); 1µmol/l Blockeroligonukleotid (SeqID-7, TIB-MolBiol).

Folgendes Temperaturprogramm wird eingesetzt: 2 Temperaturzyklen: 10 sec bei 95°C; 5 min bei 56°C; Aktivierung der Polymerase: 10 min bei 95°C; 55 Temperaturzyklen: 10 sec bei 95°C; 10 sec bei 56°C; 10 sec bei 72°C. Abschließend wird die Reaktion auf 35°C abgekühlt.

30

Die Messung der Fluoreszenzsignale erfolgt im Kanal F2.

Die Auswertung der PCR erfolgt automatisch mittels der LightCycler Software im Modus F2/F1. Als positiv gelten Signale, die signifikant über dem Hintergrundsignal der Negativkontrollen liegen. Als Ergebnis wird erwartet,  
5 dass nur solche DNA Mischungen positive Signale erzeugen, die methylierte bisulfitkonvertierte DNA enthalten. Die Signale sollten dabei unabhängig von der Menge an ursprünglicher nichtmethylierter Hintergrund DNA sein (Tabelle 1).

10

Tabelle 1 : Erwartete Ergebnisse mit verschiedenen DNA-Mischungen

Proben-Nr.	ng methylierte DNA in 10µl DNA-Mischung	ng unmethylier- te DNA in 10µl DNA-Mischung	erwartetes Ergebnis
1	1.0	0.0	positiv
2	1.0	1.0	positiv
3	1.0	10.0	positiv
4	1.0	100.0	positiv
5	0.1	0.0	positiv
6	0.1	1.0	positiv
7	0.1	10.0	positiv
8	0.1	100.0	positiv
9	0.0	0.0	negativ
10	0.0	1.0	negativ
11	0.0	10.0	negativ
12	0.0	100.0	negativ

Tabelle 2: Sequenzen der Oligonukleotide

Seq-ID	Name	Sequence
SeqID-1	brac1-F1	5'-GAAGtTGAtAGATGGGTATTtTTTGA
SeqID-2	brac1-R1	5'-CCCCCTTCCTaATCCTCAa
SeqID-3	brca1-fluo	5'-GCGGAAttTGAGAGGCGTA-fluo
SeqID-4	brca1-red	5'-red640-GCGTTGTGAAttTGGGGAG-pho
SeqID-5	Mismatchsonde1	5'-CACAACGCCTTACGCCTCTC-pho
SeqID-6	Mismatchsonde2	5'-CAAATTCGCCCCCTACCCCCC-pho
SeqID-7	Mismatch-Blocker	5'-TAATCCTCAGCACTTCCCTCACAACT -pho
SeqID-8	brca1-amplicon	5'GAAGtTGAtAGATGGGTATTtTTTGACGGGG GGTAGGGGCGGAAttTGAGAGGCGTAAGGCGTT GTGAAttTGGGGAGGGGGGtAGTTTGTAGGTC GCGAGGGAAGCGtTGAGGATTAGGAAGGGGG

fluo=3'-Fluoreszeinmodifikation (TIB-MolBiol),

red640=5'-Fluoreszeinmodifikation für Kanal F2 (TIB-MolBiol),

pho=3'-Phosphatmodifikation (TIB-MolBiol)

Durch Bisulfitkonvertierung umgewandelte nicht methylierte Cytosine werden in der Sequenz als "t" dargestellt. Nicht umgewandelte methylierte Cytosine in CpGs bleiben als "C" erhalten.



## Sequence listing

<110> Epigenomics AG

5 <120> Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-Methylierungen in DNA mit  
Hilfe von DNA-Reparaturenzymen

<160> 8

10 <210> 1  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

15 <220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 1

20 gaagttgata gatgggtatt ttttga 26

<210> 2  
<211> 19  
<212> DNA  
25 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

30 <400> 2

cccccttcct aatcctcaa 19

<210> 3  
35 <211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
40 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 3

gcggaatttg agaggcgta 19

<210> 4  
45 <211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

50 <220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 4

55 gcgttgtagaa ttttggggag 20

<210> 5  
60 <211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 5  
 5 cacaacgcct tacgcctctc 20  
 <210> 6  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 10  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 15  
 <400> 6  
 caaattccgc ccctaccccc c 21  
 <210> 7  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 20  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 25  
 <400> 7  
 taatcctcag cacttccttc acaacct 27  
 30  
 <210> 8  
 <211> 128  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 35  
 <220>  
 <223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)  
 <400> 8  
 40 gaagttgata gatgggtatt ttttgacggg gggtaggggc ggaatttgag aggcgtaagg 60  
 cgttgtgaat tttggggagg ggggtagttt gtaggtcgcg agggaaagcgt tgaggattag 120  
 gaaggggg 128

45

### Patentansprüche

1) Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen, dadurch gekennzeichnet, dass:

- 5 a) die zu untersuchende DNA chemisch oder enzymatisch so umgesetzt wird, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,
- 10 b) die umgewandelte DNA mit Oligonukleotiden hybridisiert wird, wobei die DNA des einen Methylierungsstatus Hybride mit Basenfehlpaarungen bildet, während die DNA des anderen Methylierungsstatus Hybride ohne Basenfehlpaarungen oder keine Hybride bildet,
- 15 c) ein Strang der fehlgepaarten Hybride enzymatisch geschnitten wird,
- d) die ungeschnittene DNA oder die geschnittenen Fragmente nachgewiesen werden,
- 20 e) aus dem Signal auf den Methylierungsstatus der untersuchten DNA geschlossen wird.

2) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) die DNA des eines Methylierungsstatus Hybride mit Basenfehlpaarungen bildet, während die DNA des anderen Methylierungsstatus Hybride ohne Basenfehlpaarungen bildet.

25

3) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) die DNA des eines Methylierungsstatus Hybride mit Basenfehlpaarungen bildet, während die DNA des anderen Methylierungsstatus keine Hybride bildet.

30

4) Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen, dadurch gekennzeichnet, dass:

35

- 5 a) die zu untersuchende DNA chemisch oder enzymatisch  
so umgesetzt wird, dass 5-Methylcytosin unverändert  
bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil o-  
der in eine andere Base umgewandelt wird, die sich  
im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,  
b) die umgewandelte DNA mit Oligonukleotiden hybridisiert  
wird, wobei die nachzuweisende DNA Hybride mit  
Basenfehlpaarungen bildet,  
c) der Oligonukleotid-Strang der fehlgepaarten Hybride  
10 enzymatisch geschnitten wird,  
d) die geschnittenen Oligonukleotid-Fragmente nachgewiesen  
werden,  
e) aus dem Signal auf den Methylierungsstatus der un-  
tersuchten DNA geschlossen wird.

15

5) Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen, dadurch gekennzeichnet, dass:

- 20 a) die zu untersuchende DNA chemisch oder enzymatisch  
so umgesetzt wird, dass 5-Methylcytosin unverändert  
bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil o-  
der in eine andere Base umgewandelt wird, die sich  
im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,  
b) die umgewandelte DNA mit Oligonukleotiden hybridisiert  
wird, wobei die Hintergrund-DNA Hybride mit  
Basenfehlpaarungen bildet,  
c) der DNA-Strang der fehlgepaarten Hybride enzymatisch  
geschnitten wird,  
d) die ungeschnittenen DNA nachgewiesen wird,  
e) aus dem Signal auf den Methylierungsstatus der un-  
25 tersuchten DNA geschlossen wird.

30

6) Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet,  
dass die Hintergrund-DNA mit den Oligonukleotiden mehrere  
Basenfehlpaarungen bildet.

35

7) Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass die in Schritt b) eingesetzten Oligonukleotide gleichzeitig als Primer oder Sonde in einem späteren Amplifikationsschritt eingesetzt werden.

8) Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1-3, oder 5-7, dadurch gekennzeichnet, dass der Nachweis in Schritt d) mit Hilfe einer Amplifikation erfolgt.

9) Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation oder die Detektion der Amplifikate methylierungsspezifisch erfolgt.

10) Verfahren nach einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass eine gleichzeitige Amplifikation mehrerer Fragmente erfolgt.

11) Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1-3 oder 5-10, dadurch gekennzeichnet, dass der Nachweis in Schritt d) mittels eines Mikroarrays erfolgt.

12) Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) DNA-Reparaturenzyme eingesetzt werden.

13) Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass als Enzyme TDG, Mut Y oder Mug eingesetzt werden.

14) Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass thermostabile Varianten der Enzyme eingesetzt werden.

15) Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass ein thermostabiles TDG-Enzym eingesetzt wird.

16) Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1-15, dadurch gekennzeichnet, dass die Schritte c) bis e) gleichzeitig durchgeführt werden.

5 17) Verwendung der Verfahren nach den Ansprüchen 1-16 zur Diagnose oder Prognose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Cytosin-Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten, zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen, zur Festlegung einer spezifischen  
10 Arzneimitteltherapie, zur Überwachung des Erfolges einer Arzneimitteltherapie, zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben und zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

15 18) Ein Kit, bestehend aus mindestens einer Oligonukleotidsonde und einem Reparaturenzym sowie optional einer Polymerase und weiteren für eine PCR erforderlichen Reagenzien.

20

### Zusammenfassung

Die folgende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-Methylierungen mit Hilfe von DNA-Reparaturenzymen. Dabei wird die DNA zunächst so umgewandelt, dass unmethylierte Cytosine in Uracil überführt werden, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt. Anschließend wird die DNA an Oligonukleotide hybridisiert, wobei je nach Methylierungsstatus der DNA Hybride mit oder ohne Basenfehlpaarungen gebildet werden. Danach werden die fehlgepaarten Hybride durch Reparaturenzyme geschnitten. Über unterschiedliche Wege kann anschließend der Methylierungsstatus der DNA bestimmt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere zur Diagnose und Prognose von Krebserkrankungen und anderer mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierter Krankheiten sowie zur Vorhersage unerwünschter Arzneimittelwirkungen.